

日 本 国 特 許 庁 15.10.2004  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 3 年 1 0 月 1 4 日  
Date of Application:

出 願 番 号            特 願 2 0 0 3 - 3 5 3 4 9 0  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 3 - 3 5 3 4 9 0 ]

出 願 人            北興化学工業株式会社  
Applicant(s):

REC'D 09 DEC 2004

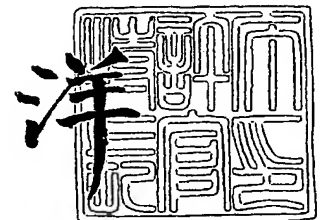
WIPO            PCT

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 1 月 2 5 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 P-B1529  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12P 7/26  
C12P 7/18  
C12N 15/53

【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県座間市立野台一丁目 4 番 6 号 サンライズ立野台 1 0 1 号  
【氏名】 山口 将憲

【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県厚木市戸田 2 2 9 7 番地 3 ソレーユ・f 2 0 2 号  
【氏名】 北 雄一

【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県海老名市門沢橋 9 0 4 番地 スターハイツヒル 3 0 3  
【氏名】 森 哲也

【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区みたけ台 7 番地 1 6  
【氏名】 神辺 健司

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都町田市金井六丁目 3 7 番 3 0 号 サニーヒルハイツ 1 0 2  
【氏名】 友田 明宏

【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県川崎市多摩区宿河原二丁目 4 2 番 2 5 - 2 0 1 号  
【氏名】 高橋 篤

【特許出願人】  
【識別番号】 000242002  
【氏名又は名称】 北興化学工業株式会社

【代理人】  
【識別番号】 100100549  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 川口 嘉之

【選任した代理人】  
【識別番号】 100090516  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】  
【識別番号】 100089244  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 遠山 勉

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 192372  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 要約書 1

## 【書類名】特許請求の範囲

## 【請求項 1】

少なくとも以下の理化学的性質を有するNAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼ

(a) 作用: 電子受容物質の存在下で、ミオーイノシトールから電子を奪いシローイノソースを生成する反応を触媒する、

(b) 至適 pH: pH4.5~5.5において活性が極大値を示す、

(c) 補因子: 1モルの酵素に1モルのヘム鉄を含有する、

(d) 阻害剤: 1 mMのS n<sup>2+</sup>イオンにより酵素活性が10%以下に阻害される、

(e) サブユニット構造: 少なくとも分子量76kダルトンと46kダルトンのタンパク質を含有するヘテロマーである、

(g) 基質特異性: D-キローイノシトール、ムコイノシトール、ミオーイノシトールに反応し、D-キロー1-イノソース、L-キロー2-イノソース、シローイノソースへ、それぞれ、変換する。アローイノシトール、シローイノシトール、L-キローイノシトール、グルコースには反応しない。

## 【請求項 2】

NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼ生産能を有するアセトバクター属に属する微生物を培養し、培養された微生物の菌体から、ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼを分離精製することを特徴とする、ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼの製造方法。

## 【請求項 3】

前記微生物がアセトバクター・エスピーAB10253株 (FERM P- 18868) である、請求項 2 記載の製造方法。

## 【請求項 4】

ミオーイノシトール及び電子受容体を含有する溶液中で、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼをミオーイノシトールに作用させてシローイノソースを生成せしめ、生成したシローイノソースを溶液中から分離精製することを特徴とする、シローイノソースの製造方法。

## 【請求項 5】

ミオーイノシトール及び電子受容体を含有する溶液中で、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼをミオーイノシトールに作用させてシローイノソースを生成させる工程、前記シローイノソースに還元剤を作用させてシローイノシトールを生成させる工程、及び前記シローイノシトールを分離精製する工程を含む、シローイノシトールの製造方法。

## 【請求項 6】

アセトバクター・エスピーのAB10253株を変異処理し、得られた変異株から、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を指標にして選別することを特徴とする、シローイノソース製造用微生物のスクリーニング方法。

## 【請求項 7】

微生物を含む天然試料の中から微生物を単離し、単離された微生物から、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を指標にして選別することを特徴とする、シローイノソース製造用微生物のスクリーニング方法。

## 【請求項 8】

請求項 6 又は 7 に記載のスクリーニング方法によって得られたシローイノソース製造用微生物を、ミオーイノシトールを含有する培地で培養することにより、ミオーイノシトールからシローイノソースを生成せしめ、生成したシローイノソースを培地から分離精製することを特徴とする、シローイノソースの製造方法。

## 【請求項 9】

請求項 6 又は 7 に記載のスクリーニング方法によって得られたシローイノソース製造用微生物を、ミオーイノシトールを含有する培地で培養することにより、ミオーイノシトールからシローイノソースを生成させる工程、前記シローイノソースに還元剤を作用させてシ

ローイノシトールを生成させる工程、及び前記シローイノシトールを分離精製する工程を含む、シローイノシトールの製造方法。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】新規酵素NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼ及び該酵素を用いたシローイノシトールの製造方法

## 【技術分野】

【0001】

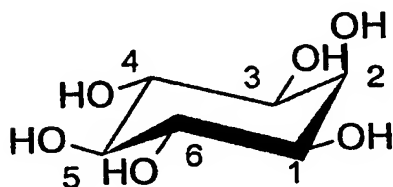
本発明は、新規なNAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼ及びその製造方法に関する。本発明はまた、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を指標としたシローイノソース製造用微生物のスクリーニング方法に関する。本発明はさらに、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼ又は該酵素の高活性株を用いたシローイノソース及びシローイノシトールの製造方法に関する。シローイノソースは、医薬品などの原料として利用することができる。また、シローイノシトールはアルツハイマー病の治療薬や、生理活性物質の合成原料、液晶化合物の合成原料として利用することができる。

## 【背景技術】

【0002】

ミオーイノシトールは次の立体構造式 (A)

【化1】



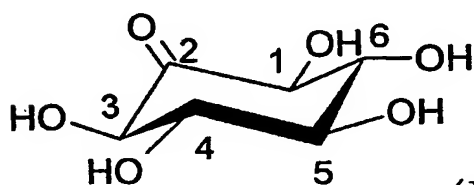
(A)

で表される天然に産する既知の物質である。

【0003】

また、シローイノソースは次の立体構造式 (B)

【化2】



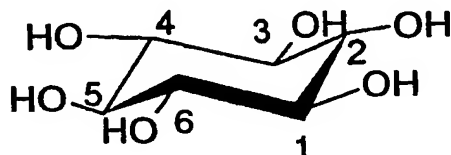
(B)

で表される既知の物質である。

【0004】

さらに、シローイノシトールは次の立体構造式 (C)

【化3】



(C)

で表される既知の化合物である。

【0005】

シローイノシトールはミオーイノシトールの立体異性体の一つで動物・植物中に広く見出される物質である。また、シローイノソースはミオーイノシトールの2位のアキシャル

水酸基が酸化された構造を有する化合物であり、これも天然物として普遍的に存在する。

【0006】

シロイノシトールはアルツハイマー病の治療薬（非特許文献1参照）や、生理活性物質の合成原料（特許文献1参照）、液晶化合物の合成原料（特許文献2参照）としての用途が期待されている物質である。

【0007】

ミオイノシトールをシロイノソースへ酸化する酵素（ミオイノシトールデヒドロゲナーゼ）は動物・藻類・酵母・細菌等多くの生物種からの報告があり、自然界に広く存在する酵素である。前記酵素を有する代表的な微生物種としては、エアロバクター エアロゲネス（非特許文献2参照）、バチルス属細菌（非特許文献3又は4参照、特許文献3～5参照）、シュドモナス属細菌等（非特許文献5又は6参照）がある。

【0008】

しかしながら、これらの報告におけるミオイノシトールデヒドロゲナーゼは、 $\text{NAD}^+$ 依存型の酵素であり、酸化のために $\text{NAD}^+$ または $\text{NADP}^+$ を要求し、工業的規模で作用させる場合、これら補酵素をリサイクルするため、発酵生産を用いなければならない、そのため基質の一部が分解される、または、基質濃度を低くしなければならないなど、工業的規模における問題点があった。

【0009】

また、ミオイノシトールをシロイノシトールへ変換する微生物としてはアグロバクテリウム属細菌が知られている（特許文献6参照）。しかし、この方法では、シロイノシトールの収率は低く、他の変換物も生じるために、工業的規模では利用できない。

【0010】

一方、アセトバクター属細菌（非特許文献7参照）は、ミオイノシトールに作用して、酸素を吸収し、シロイノソースへ酸化することが知られているが、詳細なメカニズムは検討されていない。近年になって、アセトバクター属に属する微生物 AB10253株は、高濃度のミオイノシトール濃度でも作用し、また、静止菌体でも酸化反応が進行することが示された（特許文献7参照）。そのため、これまでに知られる $\text{NAD}^+$ 依存型のミオイノシトールデヒドロゲナーゼとは、異なる機構で酸化反応が起きていると考えられるが、その詳細は不明である。

【0011】

一方、化学合成的手法でシロイノソースまたはシロイノシトールの製法としては、(i) ヘキサヒドロキシベンゼンをラネーニッケルで還元し、シロイノシトールを得る方法（非特許文献8参照）、(ii) グルコフラノース誘導体から5段階の反応でシロイノソースを得て還元し、シロイノシトールを得る方法（非特許文献9参照）、(iii) シスートリオキサートリスーホモベンゼンを原料に4段階以上の反応でシロイノシトールを得る方法（非特許文献10参照）、(iv) ミオイノシトールを白金触媒で酸化しシロイノソースを得、続いてエステル化したのち還元と加水分解を行って、シロイノシトールを得る方法（特許文献2参照）等がある。

【0012】

以上のように、ミオイノシトールを微生物により酸化しシロイノソースを生成する方法及び、シロイノソースを適当な還元剤で還元しシロイノシトールを生成する方法は公知の技術である。しかしながら、これら既知のシロイノシトールの製造方法は、いずれも工業的規模で実施する方法としては、変換活性、操作容易性、あるいは経済性の面で改善の余地があった。

【特許文献1】 米国特許 第5,412,080号公報

【特許文献2】 ドイツ連邦共和国特許 第3,405,663号公報

【特許文献3】 特開平4-126075号公報

【特許文献4】 特開平05-192163号公報

【特許文献5】 特開平06-007158号公報

【特許文献6】 特開平9-140388号公報

【特許文献 7】特開平 2003-102492 号公報

【非特許文献 1】「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)」(米国)、2000 年、275 巻 (No. 24)、p. 18495-18502

【非特許文献 2】「アーカイブズ・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジックス (Archives of Biochemistry and Biophysics)」(米国)、1956 年、J. Larner et al.、60 巻、p. 352-363

【非特許文献 3】「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)」(米国)、1979 年、254 巻、p. 7684-7690

【非特許文献 4】「マイクロバイオロジー (Microbiology)」(米国)、1994 年、140 巻、p. 2289-2298

【非特許文献 5】「モナトゼフテ・ヒュア・ケミ (Monatshefte fur Chemie)」(ドイツ)、1969 年、100 巻、p. 1327-1337

【非特許文献 6】「ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (Journal of Bacteriology)」(米国)、1977 年、131 巻、p. 872-875

【非特許文献 7】「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)」(米国)、1948 年、174 巻、p. 173-188

【非特許文献 8】「ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・ケミカル・ソサエティ (Journal of the American Chemical Society)」(米国)、1948 年、70 巻 p. 2931-2935

【非特許文献 9】「ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・ケミカル・ソサエティ (Journal of the American Chemical Society)」(米国)、1968 年、90 巻、p. 3289-3290

【非特許文献 10】「アンゲバンテ・ヒュミー (Angewandte Chemie)」(ドイツ)、1973 年、85 巻、p. 1110-1111

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

##### 【0013】

本発明は、ミオーイノシトールをシロイノソースに変換する反応を触媒する新規な酵素を提供することを課題とする。本発明はまた、ミオーイノシトールをシロイノソースに変換する能力を有する微生物をスクリーニングするための新規な方法を提供することを課題とする。本発明はさらに、シロイノソース及びシロイノシトールを効率よく製造できる新規な方法を提供することを課題とする。

#### 【課題を解決するための手段】

##### 【0014】

本発明者らは、ミオーイノシトールをシロイノソースに効率よく変換することのできる酵素を取得することができれば、そのような酵素を用いることにより、高い基質濃度のミオーイノシトールからシロイノソースを効率良く製造することが可能であると考えた。さらに、そのような酵素の高活性株をスクリーニングにより単離することができれば、そのような菌株もシロイノソースの製造に使用することができると考えた。本発明者らは、ミオーイノシトールからシロイノソースへ変換する反応を触媒することのできる、従来知られていない新しいタイプの NAD<sup>+</sup> 非依存型のミオーイノシトールデヒドロゲナーゼがあるという仮説のもと、該酵素を単離すべく、鋭意研究した。その結果、アセトバクター属に属するアセトバクター・エスピー AB10253 株において NAD<sup>+</sup> 非依存型のミオーイノシトールデヒドロゲナーゼが存在することを見出した。さらに、本発明者らは、この酵素、又はこの酵素の活性の高い微生物を使用することにより、シロイノソースを効率よく製造することができること、及び得られたシロイノソースを還元することによって高純度のシロイノシトールを効率よく製造することに成功して、本発明を完成させるに至った。

##### 【0015】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) 少なくとも以下の理化学的性質を有するNAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼ

(a) 作用: 電子受容物質の存在下で、ミオーイノシトールから電子を奪いシローイノソースを生成する反応を触媒する、

(b) 至適pH: pH4.5~5.5において活性が極大値を示す、

(c) 補因子: 1モルの酵素に1モルのヘム鉄を含有する、

(d) 阻害剤: 1 mMのS n<sup>2+</sup>イオンにより酵素活性が10%以下に阻害される、

(e) サブユニット構造: 少なくとも分子量76kダルトンと46kダルトンのタンパク質を含有するヘテロマーである、

(g) 基質特異性: D-キローイノシトール、ムコーイノシトール、ミオーイノシトールに反応し、D-キロー1-イノソース、L-キロー2-イノソース、シローイノソースへ、それぞれ、変換する。アローイノシトール、シローイノシトール、L-キローイノシトール、グルコースには反応しない。

(2) NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼ生産能を有するアセトバクター属に属する微生物を培養し、培養された微生物の菌体から、ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼを分離精製することを特徴とする、ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼの製造方法。

(3) 前記微生物がアセトバクター・エスピーAB10253株 (FERM P- 18868) である、(2)の製造方法。

(4) ミオーイノシトール及び電子受容体を含有する溶液中で、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼをミオーイノシトールに作用させてシローイノソースを生成せしめ、生成したシローイノソースを溶液中から分離精製することを特徴とする、シローイノソースの製造方法。

(5) ミオーイノシトール及び電子受容体を含有する溶液中で、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼをミオーイノシトールに作用させてシローイノソースを生成させる工程、前記シローイノソースに還元剤を作用させてシローイノシトールを生成させる工程、及び前記シローイノシトールを分離精製する工程を含む、シローイノシトールの製造方法。

(6) アセトバクター・エスピーのAB10253株を変異処理し、得られた変異株から、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を指標にして選別することを中心とする、シローイノソース製造用微生物のスクリーニング方法。

(7) 微生物を含む天然試料の中から微生物を単離し、単離された微生物から、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を指標にして選別することを中心とする、シローイノソース製造用微生物のスクリーニング方法。

(8) (6)又は(7)のスクリーニング方法によって得られたシローイノソース製造用微生物を、ミオーイノシトールを含有する培地で培養することにより、ミオーイノシトールからシローイノソースを生成せしめ、生成したシローイノソースを培地から分離精製することを特徴とする、シローイノソースの製造方法。

(9) (6)又は(7)のスクリーニング方法によって得られたシローイノソース製造用微生物を、ミオーイノシトールを含有する培地で培養することにより、ミオーイノシトールからシローイノソースを生成させる工程、前記シローイノソースに還元剤を作用させてシローイノシトールを生成させる工程、及び前記シローイノシトールを分離精製する工程を含む、シローイノシトールの製造方法。

#### 【発明の効果】

#### 【0016】

本発明のミオーイノシトールデヒドロゲナーゼはNAD<sup>+</sup>非依存型であるため、本酵素又は本酵素の高活性株を用いることにより、NAD<sup>+</sup>を反応液中に添加することなく、シローイノソースを製造することができる。さらに得られたシローイノソースを還元することにより、簡便かつ高効率で高純度のシローイノシトールを得ることができる。また、当該酵素の



活性を指標にすることにより、天然株又は変異株から、ミオーイノシトールをシローイノソースへ変換する活性の高いシローイノソースの製造用微生物を容易に選抜することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

<1>新規なNAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼ

本発明の酵素は少なくとも以下の理化学的性質を有するNAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼである。

(a) 作用：電子受容物質の存在下で、ミオーイノシトールから電子を奪いシローイノソースを生成する反応を触媒する、

(b) 至適pH：pH4.5～5.5において活性が極大値を示す、

(c) 補因子：1モルの酵素に1モルのヘム鉄を含有する、

(d) 阻害剤：1mMのS n<sup>2+</sup>イオンにより酵素活性が10%以下に阻害される、

(e) サブユニット構造：少なくとも分子量76kダルトンと46kダルトンのタンパク質を含有するヘテロマーである、

(g) 基質特異性：D-キローイノシトール、ムコイノシトール、ミオーイノシトールに反応し、D-キロー1-イノソース、L-キロー2-イノソース、シローイノソースへ、それぞれ、変換する。アローイノシトール、シローイノシトール、L-キローイノシトール、グルコースには反応しない。

【0018】

(a) の作用は、電子受容物質の存在下で、ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を測定することによって確認することができる。ここで、電子受容物質としては酸化型DCIP、PMS（フェナジンメソサルフェート）、メチレンブルー、Fe<sup>3+</sup>イオン等が例示され、これらを組み合わせて使用することができるが、好ましくは酸化型DCIPが使用される。ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼ活性は、例えば、100mMリン酸緩衝液（pH5.0）、ミオーイノシトール5mg、2, 4-ジクロロインドフェノール（酸化型DCIP）0.4mgからなる1mL溶液における600nmの吸収度変化を反応速度に換算して、1分間あたり、1μmolのミオーイノシトールが酸化される活性を1ユニットとして測定することができる。(b) の至適pHは、各pHにおいてミオーイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を測定し、酵素活性が極大を示すpHの範囲を調べることによって確認することができる。また、(d) の性質は、酵素活性測定系にS n<sup>2+</sup>イオンを添加して酵素活性を測定し、S n<sup>2+</sup>イオン非添加時の活性と比較することによって確認することができる。本発明のNAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼは、1mMのS n<sup>2+</sup>イオンにより、活性がS n<sup>2+</sup>イオン非添加時の10%以下に阻害されるものであればよく、好ましくは5%以下、より好ましくは1%以下に阻害されるものがよい。また、(e) のサブユニット構造は、例えば、SDS-PAGE（ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動）などによって確認することができる。なお、各サブユニットの76kダルトン及び46kダルトンという分子量はそれぞれおおよそその値であり、この前後数キロダルトンの値であってもよい。

【0019】

本発明の酵素は、上記性質を有している限り特に限定されないが、例えば、アセトバクター・エスピーAB10253株由来のものが挙げられる。本発明の酵素の基質特異性は上述したとおりであるが、アセトバクター・エスピーAB10253株由来の酵素について、基質濃度50mMにおける相対活性及びKm値を示すと、以下のとおりである。すなわち、D-キローイノシトール（相対活性100%、Km=8.8mM）、ムコイノシトール（相対活性68%、Km=14.5mM）、ミオーイノシトール（相対活性53%、Km=20mM）である。

【0020】

本発明の酵素は、従来知られているNAD<sup>+</sup>依存型のミオーイノシトールデヒドロゲナーゼと異なるタイプのNAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼである。特に異なる点について、両酵素を比較すると、以下の表1のようになる。

【0021】

【表1】

表1

	本願酵素(NAD <sup>+</sup> 非依存型)	従来型の酵素(NAD <sup>+</sup> 依存型)
細胞内局在	膜画分	細胞質可溶性画分
至適pH	pH4.5~5.5	pH8.0~9.0
電子受容体	ヘム鉄	NAD <sup>+</sup>

## 【0022】

<2>NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼの製造法

本発明のNAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼの製造法は、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼ生産能を有するアセトバクター属に属する微生物を培養し、培養された微生物の菌体から、ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼを分離精製することを特徴とする製造方法である。

## 【0023】

NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼの製造に使用することのできる微生物としては、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼ生産能を有する限り特に限定されないが、例えば、アセトバクター・エスピーAB10253 (FERM P-18868) が挙げられる。微生物を培養するために用いる培地は、従来知られる一般的な微生物培養に使用されるもので、炭素源、窒素源、その他栄養素などを含むものを使用することができる。ここで、炭素源として、グルコース、シュークロース、マルトースあるいは澱粉などが例示される。その濃度は、0.1%~20%、より好ましくは0.3~5%添加するのが望ましい。窒素源としては、ペプトン、酵母抽出物、カザミノ酸、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素あるいは肉エキスなどが例示される。その濃度は、0.01%~5.0%、好ましくは0.5%~2.0%添加するのが望ましい。その他必要に応じ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、マンガン、亜鉛、鉄、銅、モリブデン、リン酸、硫酸などのイオンを生成することができる無機塩類を培地中に添加することが好ましい。培養液中の水素イオン濃度はpH3~10、好ましくはpH5~7に調整し培養すると、効率よく本酵素の発現を誘導することができる。なお、%で示した値は、w/vの百分率を示すものであり、濃度を%で表示する場合は、以下においても同様とする。

## 【0024】

なお、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼの発現を誘導するために、ミオーイノシトールを含有する培地を使用することが好ましい。この場合、加えるミオーイノシトールの濃度は、0.2%~15%、好ましくは1%~5%、より好ましくは3%が適当である。

## 【0025】

培養条件は、培地の種類によっても異なるが、培養温度は好ましくは12~35℃、より好ましくは20~27℃であり、また、培養は液体培地を振とうしたり、液体培地中に空気あるいは酸素ガスを吹き込むなどして好氣的に行うことが好ましい。培養期間は、培養液中にミオーイノシトールが完全に消失し、且つ、シロイノソースが最大の蓄積量を示すまで行うことが好ましく、通常1~10日、好ましくは3~8日である。

## 【0026】

この様に培養した菌体から酵素を分離精製することにより、本発明の酵素を得ることができる。酵素の分離精製は、通常のタンパク質の精製方法と同様にして行うことができる。以下に具体例を挙げて説明するが、分離精製方法はこれらに限定されない。

## 【0027】

まず、培養して得られた菌体を遠心分離やフィルターろ過などにより沈殿又は濃縮する。次に、得られた菌体沈殿物、または菌体懸濁液を破碎する。破碎は、フレンチプレス、ダイノミール、超音波破碎などの方法が使用できるが、超音波破碎が好ましい。例えば、

培養液 1 リットルから集められた菌体の場合、水により洗浄を行ない、最終的に 50 ml の水に懸濁し、この懸濁液に超音波を照射して細胞を破碎し、12000rpm の遠心分離によって、沈殿を得る。さらに得られた沈殿を、適当な緩衝液、例えば、トリス緩衝液、リン酸緩衝液（濃度は 2mM~100mM、pH は pH6.0~8.0）に懸濁し、ここに、界面活性剤を加えることで膜酵素を抽出することができる。界面活性剤の種類としては、Triton X-100（登録商標）、Tween 20（登録商標）、Tween 80（登録商標）などが例示でき、その濃度は、0.02%~1.0% で使用できるが、好ましくは Triton X-100 を 0.6% の濃度で使用するのが望ましい。

#### 【0028】

上記で得られた界面活性剤を加えた懸濁液を、低温で 1~5 時間程度インキュベートすることにより、酵素を抽出することができる。この後、再度遠心分離を行ない、上清に可溶化してきた酵素を得ることができる。この様にして得られた酵素液は、このまま、シロイノソースの製造のために使用することもできるが、必要があれば、通常の酵素の濃縮に使用される方法により、酵素を濃縮し、使用することができる。酵素の濃縮方法として、例えば、硫酸分画、限外ろ過などが例示される。また、より高度に精製するためには、さらに以下の処理を行うことが好ましい。

#### 【0029】

可溶化した酵素は、カラムクロマトグラフィー精製を行うことが好ましい。カラムクロマトグラフィーとしては、DEAE カラムクロマトグラフィーなどが挙げられる。DEAE カラムは、DEAE 基を有していれば、特に担体の性状が異なっても使用できる。好ましくは DEAE トヨパール（東ソー社製）が例示される。DEAE トヨパールを用いて精製する場合、上述した酵素液は、塩強度 20 mM に調製して、カラムに加えるとよい。その様にしてカラムに吸着させたタンパク質は次に、界面活性剤を含まない 20 mM の緩衝液（pH は pH6.0~8.0）に、NaCl、または KCl の直線濃度勾配をかけた溶液を通過させ、タンパク質を溶出させる。NaCl の場合 0mM から、500mM の濃度勾配、KCl の場合、0mM から 350mM の濃度勾配が使用される。次に、このカラムを、再度、界面活性剤を含まない 20 mM の緩衝液（pH は pH6.0~8.0）を通して、洗浄し、次に界面活性剤を含む 20 mM の緩衝液（pH は pH6.0~8.0）に、NaCl、または KCl の直線濃度勾配をかけた溶液を通過させ、タンパク質を溶出させる。NaCl の場合 0mM から、500mM の濃度勾配、KCl の場合、0mM から 350mM の濃度勾配が使用される。添加される界面活性剤は、Triton X-100、Tween 20、Tween 80 などが例示でき、その濃度は、0.02%~1.0% で使用できるが、好ましくは Triton X-100 を 0.1% の濃度で使用するのが望ましい。このような条件の中で、本酵素は、界面活性剤を含む 20mM 緩衝液に 100~170mM の NaCl を含む溶液によって、カラムから溶出される。この様にして得られた酵素液は、このまま、シロイノソースの製造のために使用することもできるが、より高度に精製するためには、さらに処理がなされる。

#### 【0030】

なお、酵素活性を指標にして精製する場合、酵素活性の測定は、例えば、タンパク溶液を 100mM リン酸緩衝液（pH 5.0）、ミオーイノシトール 5mg、2, 4-ジクロロインドフェノール（酸化型 DCIP）0.4mg からなる 1ml 溶液に加え、600nm の吸収度変化を反応速度に換算して、1 分間あたり、1  $\mu$ mol のミオーイノシトールが酸化される活性を 1 ユニットとして測定することができる。

#### 【0031】

本酵素をさらに精製する場合、本酵素液を透析や、限外ろ過により脱塩した後に、例えば、ヒドロキシアパタイトカラムに加えることが好ましい。この場合、ヒドロキシアパタイトカラムに吸着したタンパク質は、界面活性剤を含むリン酸緩衝液（pH 7.0）の直線濃度勾配をかけた溶液を通過させることによって溶出される。この時使用されるリン酸緩衝液の濃度勾配は 0mM から 500mM の濃度勾配が使用される。また、添加される界面活性剤は、Triton X-100、Tween 20、Tween 80 などが例示でき、その濃度は、0.02%~1.0% で使用できるが、好ましくは Triton X-100 を 0.1% の濃度

で使用するのが望ましい。このような条件の中で、本酵素は、界面活性剤を含む210~260 mMのリン酸緩衝液によって、カラムから溶出される。この様にして得られた酵素液は、ほぼ、純粋なNAD<sup>+</sup>非依存ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼを含んでおり、このまま、シロイノソースの製造のために使用することができる。

#### 【0032】

##### <3>シロイノソース製造用微生物のスクリーニング方法

本発明のシロイノソース製造用微生物のスクリーニング方法は、アセトバクター・エスピーのAB10253株を変異処理し、得られた変異株から、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を指標にして選別することを特徴とするスクリーニング方法である。

#### 【0033】

ここで、指標となるNAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼ活性の測定は、例えば、微生物菌体から得られた膜画分を100mMリン酸緩衝液(pH5.0)、ミオーイノシトール5mg、2, 4-ジクロロインドフェノール(酸化型DCIP) 0.4mgからなる1mL溶液に加え、600nmの吸収度変化を測定することによって行うことができる。選別の基準としては、例えば、上記方法で活性を測定して比較した場合に、非変異AB10253株の1.2倍以上、好ましくは2倍以上のNAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を示す菌株を選別することが好ましい。

#### 【0034】

アセトバクター・エスピーAB10253株を変異処理する方法は、通常の微生物の変異方法が使用できる。例えば、UV照射、放射線照射などの物理的変異方法の他、Nニトロソグアニジン、メタンスルホン酸エチル、亜硝酸、メタンスルホン酸メチル、アクリジン色素、ベンゾピレン、硫酸ジメチルなどの変異剤の混合による化学的変異方法が例示される。

#### 【0035】

これらの変異処理を施したアセトバクター・エスピーから、シロイノソース製造用微生物をスクリーニングする方法を以下に例示する。ただし、スクリーニング方法は、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を指標にして行う限り、この方法に限定されない。

#### 【0036】

変異処理したAB10253株を、ミオーイノシトールと栄養成分を含有する寒天培地に、9 cm径のシャーレ1枚当たり、10~300コロニー、好ましくは100~150コロニーが形成する様に広げる。ここで、培地の栄養成分として加えられる炭素源、窒素源、その他栄養素としては、従来知られる一般的な微生物培養に使用されるものが使用可能である。例えば、炭素源として、グルコース、シュクロース、マルトースあるいは澱粉などが例示される。その濃度は、0.1%~20%、より好ましくは0.3~5%添加するのが望ましい。窒素源としては、ペプトン、酵母抽出物、カザミノ酸、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素あるいは肉エキス、などが例示される。その濃度は、0.01%~5.0%、好ましくは0.5%~2.0%添加するのが望ましい。

#### 【0037】

その他必要に応じ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、マンガン、亜鉛、鉄、銅、モリブデン、リン酸、硫酸などのイオンを生成することができる無機塩類を培地中に添加することが有効である。培養液中の水素イオン濃度はpH3~10、好ましくはpH5~7に調整し培養すると、効率よく本酵素を誘導することができる。

#### 【0038】

培養はコロニーが十分形成する時間、培養すれば良く、約3日でコロニーが形成する。培養温度は、好ましくは菌の生育適温である25~30℃、より好ましくは27℃で培養される。

#### 【0039】

コロニーは単離培養し、個々に、NAD<sup>+</sup>非依存ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を測定し、活性の強い株を選抜することもできるが、以下に述べる様に、9 cm径のシャ

ーレを用いて、寒天培地の上で効率良く、選抜することができる。

#### 【0040】

培養後、9 cm径のシャーレに形成したコロニーの上に、検定用寒天培地を10mlゆっくりと注ぎ入れる。検定用寒天培地の組成は、100mMリン酸緩衝液、1%ミオーイノシトール、0.4%酸化型DCIPからなる組成に0.5%寒天になるように寒天を加えて、寒天を溶解後、36℃まで冷却し、寒天が固まらない様に調製した粘潤な溶液である。このような処理を行った検定用寒天培地は、27℃でゆっくりと冷却され、9 cm径のシャーレに形成したコロニーの上に、重層された形で、固化する。

#### 【0041】

処理後、27℃で、シャーレをインキュベートすることにより、徐々にNAD<sup>+</sup>非依存ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼ活性の大きさに従って、寒天培地上に一面に広がった酸化型DCIPの青色が、コロニーのまわりのみ、透明になり始めるのが観察される。この時、より速く、透明になった所のコロニーを新しい培地に継代し、NAD<sup>+</sup>非依存ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼ活性の高い株を取得することができる。

#### 【0042】

また、ここで得られたシロイノソース生産微生物に、さらに変異処理を施し、酸素呼吸能力を指標にしてスクリーニングを行うことにより、酸素を電子受容体として、ミオーイノシトールをシロイノソースに変換する能力を持った菌株を育種することが可能である。ここで、酸素呼吸能力とは低酸素条件でよく生育する能力をいい、低酸素条件とは、例えば酸素濃度3%以下の条件をいう。アセトバクター・エスピーAB10253株は絶対好気性菌なので、低酸素条件でよく生育するコロニーを新しい培地に継代することで酸素呼吸能力の高い菌株を得ることができる。

#### 【0043】

さらに、上記のスクリーニング方法は、天然の微生物に対しても行うことができる。すなわち、本発明のもう一つのスクリーニング方法は、微生物を含む天然試料の中から微生物を単離し、単離された微生物から、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を指標にして選別することの特徴とするスクリーニング方法である。ここで、天然の微生物を含む試料とは、例えば、天然の土壌等が挙げられる。天然試料の中から微生物を単離する方法は、例えば、天然試料の懸濁液又はその希釈液を寒天培地に塗布し、天然試料に含まれる微生物を独立のコロニーとして寒天培地上に生育させる方法等が挙げられる。単離された微生物の中からシロイノソース製造用微生物をスクリーニング方法は、培地のpHを3~4、好ましくは3.5にする点を除いて、アセトバクター・エスピーAB10253株を用いる場合と同様の操作が適用できる。

#### 【0044】

##### <4>シロイノソースの製造方法

本発明のシロイノソースの製造方法は、ミオーイノシトールに、NAD<sup>+</sup>非依存ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼ又は同酵素の高活性株（シロイノソース製造用微生物）を作用させることを特徴とする製造方法である。

#### 【0045】

##### <4>-1. NAD<sup>+</sup>非依存ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼを用いたシロイノソースの製造方法

本発明の「NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼを用いたシロイノソースの製造方法」は、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼをミオーイノシトール及び電子受容体を含む溶液中でミオーイノシトールに作用させてシロイノソースを生成せしめ、生成したシロイノソースを溶液中から分離精製することの特徴とする製造方法である。ここでNAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼは、既述した方法によって得られるものを使用することができる。なお、本酵素はミオーイノシトールからシロイノソースを生成する活性を有する限り、その精製の程度は問わない。

#### 【0046】

ここで、基質であるミオーイノシトールは0.1%~20%、好ましくは、5%~10%の濃度

で使用する。本反応に使用される酵素液は、上述した粗酵素液、または高度に精製された酵素液を使用することができる。反応時の pH は、好ましくは pH 5.0 に保たれる様にし、pH をモニターして、アルカリ性溶液、または、酸性溶液を適時、添加できる他、適当な緩衝液を使用することができる。緩衝液の例としては、pH 5.0 付近で緩衝能力のあるものであれば特に限定されずに使用することができ、好ましくはリン酸緩衝液が使用される。

#### 【0047】

この酵素を用いる製造方法においては、反応液中に電子受容物質を加える必要がある。ここで、電子受容物質としては酸化型 DCIP の他、PMS (フェナジンメソサルフェート)、メチレンブルー、 $\text{Fe}^{3+}$  イオン等が例示され、これらを組み合わせて使用することができるが、好ましくは酸化型 DCIP が使用される。加えられる電子受容物質の量はミオイノシトール 1 モルに対して、1 モルの量が必要であり、これを相当するミオイノシトールのモル数に対して適時加えることができる。反応が進むに従い、これら電子受容物質の濃度が高くなる時、還元型電子受容物質が析出することがあるが、その場合は、遠心分離、またはろ過などの操作により、除去することができる。本反応は電子受容物質の溶解度により、不均一系である場合があり、攪拌下に反応を行なうことが好ましい。

#### 【0048】

本反応の反応温度は、酵素が失活しない程度で作用させるのであれば、特に限定されないが、好ましくは 20℃～40℃ で作用させることができる。反応時間は好ましくは 1～72 時間であり、より好ましくは 8～12 時間である。生成したシロイノソースは、例えば再結晶法などによって分離精製することができる。

#### 【0049】

##### <4>-2. 微生物を用いたシロイノソースの製造方法

本発明の「微生物を用いたシロイノソースの製造方法」は、本発明のスクリーニング方法によって得られるシロイノソース製造用微生物を、ミオイノシトールを含有する培地で培養することにより、ミオイノシトールからシロイノソースを生成せしめ、生成したシロイノソースを培地から分離精製することを特徴とする製造方法である。

#### 【0050】

ここで用いる液体培地の組成は、微生物がミオイノシトールからシロイノソースを生成できる限り何ら特別の制限はなく、例えばシロイノソースへの変換原料であるミオイノシトールに加えて、炭素源、窒素源、有機栄養源、無機塩類等を含有する培地を挙げることができる。合成培地・天然培地のいずれも使用できる。具体的には、ミオイノシトールを 0.1%～40%、より好ましくは 10%～30% 添加し、炭素源としては、グリセロール、シュクロース、マルトースあるいは澱粉を 0.1%～20%、より好ましくは 0.3～5%、窒素源としては、酵母エキス、ペプトン、カザミノ酸、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウムあるいは尿素等を 0.01%～5.0%、好ましくは 0.5%～2.0% 含有する培地が望ましい。

#### 【0051】

その他必要に応じ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、マンガン、亜鉛、鉄、銅、モリブデン、リン酸、硫酸などのイオンを生成することができる。無機塩類を培地中に添加することが有効である。培養液中の水素イオン濃度は pH 4～10、好ましくは pH 5～9 に調整し培養すると、効率よくシロイノソースを得ることができる。

#### 【0052】

培養条件は、菌株や培地の種類によっても異なるが、培養温度は好ましくは 12～35℃、より好ましくは 20～27℃ であり、また、培養は液体培地を振とうしたり、液体培地中に空気あるいは酸素ガスを吹き込むなどして好氣的に行うことが好ましい。培養期間は、培養液中にミオイノシトールが完全に消失し、且つ、シロイノソースが最大の蓄積量を示すまで行うことが好ましく、通常 1～10 日、好ましくは 3～8 日である。

#### 【0053】

培養液から目的物を分離精製する方法は、通常の水溶性中性物質を分離精製する一般的な方法を応用することができる。例えば、培養液から菌体を除去した後、培養上清液を活



性炭やイオン交換樹脂等で処理することにより、シロイノソース以外の不純物をほとんど除くことができる。ただし、強塩基性陰イオン交換樹脂のOH<sup>-</sup>型はシロイノソースを化学変化させるので使用しないほうが好ましい。その後、再結晶等の方法を用いることにより、目的物質を単離することができる。

#### 【0054】

以下にシロイノソースの分離精製の具体的方法を例示する。ただし、分離精製の方法は、これらに限定されない。まず、シロイノソースが蓄積した培養上清液を、不望成分の除去の目的で強酸性陽イオン交換樹脂、例えばデュオライト(登録商標)C-20(H<sup>+</sup>型)(住友化学製)を充填したカラムに通過させ通過液を集め、その後このカラムに脱イオン水を通過させ洗浄して洗浄液を集め、得られた通過液及び洗浄液を合併する。こうして得られた溶液を弱塩基性陰イオン交換樹脂、例えばデュオライト(Duolite:登録商標)A368S(遊離塩基型)を充填したカラムに通過させ通過液を集め、その後このカラムに脱イオン水を通過させ洗浄して洗浄液を集め、得られた通過液及び洗浄液を混合して、シロイノソースを含みそれ以外の不純物をほとんど含まない水溶液を取得する。この水溶液を濃縮して得られたシロイノソースの濃厚溶液に、エタノールの適量を加え、室温または低温で一晩放置すると、純粋なシロイノソースの結晶を晶出できる。

#### 【0055】

##### <5>シロイノシトールの製造法

本発明のシロイノシトールの製造法は、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオイノシトールデヒドロゲナーゼ又は該酵素の高活性株を用いてミオイノシトールからシロイノソースを生成させ、得られたシロイノソースを還元してシロイノシトールを得る事の特徴とする製造方法である。

#### 【0056】

この製造方法において、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオイノシトールデヒドロゲナーゼ又は該酵素の高活性株(シロイノソース製造用微生物)を用いてミオイノシトールからシロイノソースを生成させる工程は、既述した方法によって行うことができる。この工程によって得られるシロイノソースは、単離精製して還元工程に用いてもよいが、単離精製せずに還元工程に用いてもよい。シロイノソース製造用微生物を用いてシロイノソースを生成させる場合、培養液中にシロイノソースを生成蓄積させた後、シロイノソースを単離せず、菌体のみを分離して得た培養液を還元工程に用いてもよい。

#### 【0057】

反応液系中でシロイノソースをシロイノシトールに還元できる還元剤としては、特に限定されないが、例えば、水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素リチウム、水素化ホウ素カリウム、水素化トリメトキシホウ素ナトリウム、シアン化水素化ホウ素ナトリウムが挙げられる。これらの還元剤によりシロイノソースを還元すると、シロイノシトール及びミオイノシトールが生成する。その生成比率は反応温度、還元試薬の種類によって異なるが、一般的にはシロイノシトール:ミオイノシトール=約4:6の混合物が得られる。したがって、混合物からシロイノシトールを分離精製する必要がある。

#### 【0058】

還元反応液からシロイノシトールを分離精製するには、通常の水溶性中性物質を単離精製する一般的な方法を応用することができる。例えば、まず、反応液を活性炭やイオン交換樹脂等で処理することにより、シロイノシトール及びミオイノシトールを含みそれ以外の不純物をほとんど含まない水溶液を得る。この水溶液からシロイノシトールだけを取得するには、主に水に対する溶解度の差を利用することが有効である。すなわち、前記の水溶液を濃縮し、水に対する溶解度の低いシロイノシトールを固体として析出せしめこれを取得する方法などを使用することができる。

#### 【0059】

##### [実施例]

以下、実施例を示して本発明を具体的に説明する。

##### 【実施例1】

## 【0060】

<アセトバクター・エスピーAB10253株からのNAD<sup>+</sup>非依存のミオーイノシトールデヒドロゲナーゼの単離>

500ml容ワッフル付き三角フラスコに、ミオーイノシトール3g、酵母エキス (FNI205: Lallemand BI社製) 1g、グルコース0.5gを加え、100mlになる様に水に溶解し、pH5.0に調整し、オートクレーブにより滅菌した培地を4本作製し、これに、アセトバクター・エスピーAB10253株をスラントから、それぞれ1白金耳加えて、2日間、27℃、ロータリーシェーカーでプレ培養した。

## 【0061】

次に、50リットル容ジャーファメンターに、ミオーイノシトール1.2kg、酵母エキス (FNI205: Lallemand BI社製) 0.4kg、グルコース0.2kgを加え、40リットルになる様に水に溶解し、pH5.0に調整し、オートクレーブにより滅菌した。これにプレ培養したアセトバクター・エスピーAB10253株の菌液約400mlを加えて、3日間、27℃、通気量1vvm、回転数200rpmで培養した。

## 【0062】

培養後、連続遠心機を用いて、菌体を沈殿として得た。得られた菌体は水2リットルに再懸濁し、遠心分離によって、洗浄菌体を得た後に、20mMトリス緩衝液pH7.0 2リットルに懸濁した。次に、この懸濁液に超音波を照射し、菌体を破碎した。菌体破碎液は、破碎した菌体を沈殿させるため、遠心分離を行ない、沈殿物として、破碎菌体を得た。この沈殿物に、20mMトリス緩衝液pH7.0、0.6% Triton X-100 (Kodak社製) 500mlを加えて、懸濁し、3時間、15℃で酵素を抽出した。その後、遠心分離を行ない、上清の粗酵素液420mlを取り出した。

## 【0063】

粗酵素液420mlは、限外ろ過装置 (MW30000cut off) によって150mlまで濃縮し、この濃縮液を、20mMのトリス緩衝液 (pH7.0) で平衡化したDEAEトヨパールカラム400mlを通過させ、タンパク質を吸着させた。カラムに吸着させたタンパク質は次に、界面活性剤を含まない20mMのトリス緩衝液 (pH7.0) に、NaCl 0mMから、500mMの直線濃度勾配をかけた溶液 (総量1.6リットル) を1分間に10mlの速度で通過させ、タンパク質を溶出させた。溶出液は40mlずつの画分に分画した。次に、このカラムを、再度、界面活性剤を含まない20mMのトリス緩衝液 (pH7.0) 600mlを通して、洗浄し、次に0.1% Triton X-100を含む20mMのトリス緩衝液 (pH7.0) に、NaCl 0mMから、500mMの直線濃度勾配をかけた溶液 (総量1.6リットル) を1分間に10mlの速度で通過させ、タンパク質を溶出させた。溶出液は40mlずつの画分に分画した。

## 【0064】

各画分の酵素活性の測定は、標準的な方法として、タンパク溶液50μlに100mMリン酸緩衝液 (pH5.0)、ミオーイノシトール5mg、2, 4-ジクロロインドフェノール (酸化型DCIP) 0.4mgからなる1ml溶液の600nmの吸収度変化を反応速度に換算して、1分間あたり、1μmolのミオーイノシトールが酸化される活性を1ユニットとして測定した。

## 【0065】

その結果、本酵素は、0.1% Triton X-100を含む20mMのトリス緩衝液 (pH7.0)、NaCl 100~170mMの溶液画分に溶出することが判った。次に、この画分 (240ml) を集めて、限外ろ過装置 (MW30000cut off) によって30mlまで濃縮し、0.1% Triton X-100を含む20mMのトリス緩衝液 (pH7.0) 100mlを加えてさらに濃縮し、30mlまで濃縮された溶液に、20mMのトリス緩衝液 (pH7.0) を70ml加えて、脱塩を行なった。

## 【0066】

この様にして調製した酵素液は次に、0.1% Triton X-100を含む20mMのトリス緩衝液 (pH7.0) で平衡化したヒドロキシアパタイトカラム100mlを通過させ、タンパク質を吸着させた。カラムに吸着させたタンパク質は、次に、0.1% Triton X-100を含むトリス緩衝液 (pH7.0) に、リン酸緩衝液 (pH7.0) を0mMから、500



mMの直線濃度勾配をかけた溶液(総量400ml)を1分間に3mlの速度で通過させ、タンパク質を溶出させた。溶出液は10mlずつの画分に分画し、各画分の酵素活性を測定した。

#### 【0067】

その結果、本酵素は、0.1% Triton X-100を含む20mMのトリス緩衝液(pH7.0)、リン酸緩衝液 100~170mMの溶液画分に溶出することが判った。この様にして得られた酵素液は、ほぼ、純粋なNAD<sup>+</sup>非依存ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼを含んでいた。次に、この画分(40ml)を集めて、限外ろ過装置(MW30000cut off)によって5mlまで濃縮し、20mMのトリス緩衝液(pH7.0) 100mlを加えてさらに5mlまで濃縮し、脱塩を行なった。

#### 【0068】

この様にして調製されたこの濃縮液を、再度、0.1% Triton X-100を含む20mMのトリス緩衝液(pH7.0)で平衡化したDEAEトヨパールカラム(東ソー社製) 20mlを通過させ、タンパク質を吸着させた。カラムに吸着させたタンパク質は次に、0.1% Triton X-100を含む20mMのトリス緩衝液(pH7.0)に、NaCl 50mMから、250mMの直線濃度勾配をかけた溶液(総量160ml)を1分間に1mlの速度で通過させ、タンパク質を溶出させた。溶出液は4mlずつの画分に分画した。分画後、各画分の酵素活性測定と、活性のある各画分のSDS電気泳動を行なった。

#### 【0069】

その結果、本酵素の酵素活性と相関性のあるタンパク質のバンドがSDS電気泳動から、明らかになった。前後の活性のない画分に由来するタンパク質のバンドを除去すると、本酵素は、少なくとも分子量約76kダルトンと約46kダルトンのタンパク質を含有する酵素であることが判明した。

#### 【0070】

また、酵素の活性のある画分は赤色の色を有し、UVスペクトルパターンからチトクロムCを含有することが判った。さらに目的タンパク質の含有量と、チトクロムCの吸光度から本酵素1モルには1モルのチトクロムCが含有されていることが判明した。

#### 【0071】

至適pHの測定は、酵素活性測定の際、緩衝液及びpHを変えて測定を行なった。緩衝液は、100mMリン酸緩衝液(pH3~8)、100mMトリス緩衝液(pH7~8)及び100mM炭酸緩衝液(pH8~11)を用いた。その結果、本酵素はpH4.5~5.5に極大活性を有することが判った。さらに、標準的酵素活性測定(100mMリン酸緩衝液(pH5.0))の際に、各種重金属イオン(Sn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Fe、Zn<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>)を加えて測定したところ、本酵素は、Sn<sup>2+</sup>イオンにより特異的に阻害されることが判った。酵素活性は、1mMのSn<sup>2+</sup>イオン存在下において、Sn<sup>2+</sup>イオン非存在下の活性の1%以下まで阻害された。

#### 【0072】

また、本酵素は膜画分から、Triton X-100によって抽出される酵素であり、抽出酵素は、還元型DCIP存在下に、ミオーイノシトールを酸化するが、還元型DCIP非存在下では酸素吸収は起きないことを確認した。このことは、生体中で細胞膜電子伝達系と共役し、ミオーイノシトールから電子を奪いシロイノソースを生成することを意味する。

#### 【0073】

本酵素の基質特異性は、ミオーイノシトールの代わりに各種糖を最終濃度50mM含む溶液で酵素活性を測定した。また、活性のある糖について、糖の濃度を変えて酵素活性を測定し、Km値を測定した。さらに、酸化反応物をHPLCで分析して、どのような物質が生成するかを測定した。HPLC条件は、カラムにWakosil5NH2カラムφ4.6×250mm(カラム温度40℃)、移動相に80%アセトニトリル(流速2ml/min)、検出器にRI検出器を用いて測定した。

#### 【0074】

結果として、本酵素は、D-キローイノシトール(相対活性100%: Km=8.8mM)

、ムコイノシトール（相対活性68%： $K_m=14.5\text{mM}$ ）、ミオイノシトール（相対活性53%： $K_m=20\text{mM}$ ）に反応し、D-キロー1-イノソース、L-キロー2-イノソース、シロイノソースへ、それぞれ、変換する。アロイノシトール、シロイノシトール、L-キローイノシトール、グルコースには反応しないことが判った。

### 【実施例2】

#### 【0075】

<NAD<sup>+</sup>非依存のミオイノシトールデヒドロゲナーゼによるミオイノシトールのシロイノソースへの変換>

実施例1と同様にして、40Lジャーファメンターから精製を行ない、途中のヒドロキシアパタイトカラム100mlにより精製、脱塩を行なった5mlの酵素溶液を、酵素液として、以下の変換反応を行なった。

#### 【0076】

400ml容の遠心チューブに、ミオイノシトール30g（166.7mmol）、1Mリン酸緩衝液（pH5.0）15mlを加えて300mlに水で希釈して、ミオイノシトールを溶解させた。これに、30℃で、酵素液1mlを加えて攪拌しながら、還元型DCIP（Na塩）8gを徐々に加えた。還元型DCIPに由来する青色が消失した後、青色の消失と共に生じる白色の不溶物（酸化型DCIP）を遠心分離で沈殿させ、上清を新たな400ml容の遠心チューブに移しかえた。さらに本溶液を1規定リン酸によりpHを5.0に調製し、攪拌しながら、さらに還元型DCIP（Na塩）を8gずつ加えた。この操作を、6回繰返し、合計48gの還元型DCIP（Na塩）に加え、青色が消失した段階で、最後に3gの還元型DCIP（Na塩）を加え、1時間放置後、遠心分離により、上清を取り出した。このような操作によって、上清292mlを得た。操作時間は8時間を要した。

#### 【0077】

次に、得られた上清は、カラムに詰めた強酸性イオン交換樹脂（DuoliteC20、H<sup>+</sup>タイプ）100mlに溶解液を1分間に1.5mlの流速で通過させ、得られた溶出液を、カラムに詰めた弱塩基性イオン交換樹脂（Duolite368S、OH<sup>-</sup>タイプ）150mlに通過させ、さらに、得られた溶出液を、カラムに詰めた活性炭50mlに通過させた。得られた溶出液を濃縮し、白色粉末26.5g（148.9mmol）を得た（収率89%）。本物質をNMRと、HPLCにより分析した結果、本物質には、シロイノソースが99%、ミオイノシトール1%が含まれていた。

### 【実施例3】

#### 【0078】

<NAD<sup>+</sup>非依存性ミオイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を指標にした、アセトバクター・エスピーAB10253株の変異株からのスクリーニング>

試験管に入れた酵母エキス（Difco社製）1%、グルコース0.5%を含むpH5.0の液体培地5mlを滅菌し、これに、スラントからアセトバクター・エスピーAB10253株を1白金耳加えて、27℃、16時間、振盪培養を行なった。培養液2.5mlを滅菌チューブにとり出して、3000×gの遠心分離を行ない、菌体を集菌した。上清を捨て、200mMリン酸緩衝液（pH8.0）2.5mlに再度懸濁し、3000×gの遠心分離を行ない、菌体を集菌した。上清を捨て、200mMリン酸緩衝液（pH8.0）2.5mlに再度懸濁し、この内、2.0mlを、滅菌した100ml容の三角フラスコに入れ、0.5mlの40%グルコース溶液と、7.5mlの200mMリン酸緩衝液（pH8.0）を加え混ぜ合わせ、これに、20μlのメタンスルホン酸エチルを加えて、30℃、45分間、振とう培養を行なった。処理後、1mlを滅菌チューブにとり出し、300×gの遠心分離を行ない、菌体を集菌した。上清を捨て、200mMリン酸緩衝液（pH7.0）2.5mlに懸濁し、3000×gの遠心分離を行ない、菌体を集菌する。上清を捨て、200mMリン酸緩衝液（pH7.0）2.5mlに再度懸濁し、変異処理菌液を得た。

#### 【0079】

これらの変異処理を施したアセトバクター・エスピーAB10253株は、次に、3%ミオイノシトール、酵母エキス（Difco社製）1%、グルコース0.5%、1.5%寒天を含むpH5.0の培地を滅菌し、9cm径のシャーレ中で固化させた寒天培地に、シャーレ1枚当たり、変

異処理菌液0.12mlを広げて、27℃、2日間培養した。この操作によって、生菌数は約1.6%に減少した。また、シャーレ1枚当たり約95~125コロニーが形成した。

#### 【0080】

培養後、9cm径のシャーレに形成したコロニーの上に、100mMリン酸緩衝液、1%ミオイノシトール、0.4%酸化型DCIPからなる組成液をろ過滅菌し、これに、オートクレーブ滅菌した1%寒天を熱いうちに等量混合し、36℃まで冷却後、寒天が固まらない様に調製した粘潤な溶液を10mlゆっくりと注ぎ入れた。このような処理を行なった寒天培地は、27℃でゆっくりと冷却され、9cm径のシャーレに形成したコロニーの上に、重層された形で、固化した。

#### 【0081】

処理後、27℃で、シャーレをインキュベートすることにより、徐々にNAD<sup>+</sup>非依存ミオイノシトールデヒドロゲナーゼ活性の大きさに従って、寒天培地上に一面に広がった酸化型DCIPの青色が、コロニーのまわりのみ、透明になり始めるのが観察された。この時、より速く、透明になった所のコロニーを、滅菌した針でつついて、新しい培地に継代し、1次選抜で、全コロニー数2154コロニーから、NAD<sup>+</sup>非依存ミオイノシトールデヒドロゲナーゼ活性の高い株を22株、取得することができた。

#### 【0082】

次に、試験管に入れた3%ミオイノシトール、酵母エキス (Difco社製) 1%、グルコース0.5%を含むpH5.0の液体培地5mlを滅菌した培地に、2次選抜として、上記で得た2株のコロニーを形成した菌を、それぞれ植菌した。27℃、3日間、振盪培養を行なった後、培養液1mlを試験管に取りだし、3000×gの遠心分離を行ない、菌体を集菌した。上清を捨て、菌体の入った試験管に10%ミオイノシトール、50mMリン酸緩衝液 (pH5.0) を含む溶液を1ml加え、27℃、4時間、振盪培養を行なった後、16000×gの遠心分離を行ない、上清に含まれるミオイノシトールからシロイノソースの変換率をHPLCで測定した。一方、培養液5mlの内、0.5mlを滅菌チューブに取りだし、3000×gの遠心分離を行ない、上清を捨て、沈殿の菌体は水で洗浄後、NAD<sup>+</sup>非依存ミオイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を測定した。

#### 【0083】

その結果、22株の変異株のうち、変異前の菌と比べて、NAD<sup>+</sup>非依存ミオイノシトールデヒドロゲナーゼ活性が1.3倍以上に増加した菌株は、3株 (系統No. E6-55、H2-68、B7-14) あり、それぞれ、1.6倍、2.2倍、2.8倍に増加していた。またこれらの、ミオイノシトールからシロイノソースの変換率は、それぞれ、1.1倍、1.4倍、1.5倍に増加しており、NAD<sup>+</sup>非依存ミオイノシトールデヒドロゲナーゼ活性が1.3倍以下の株のミオイノシトールからシロイノソースの変換率は、変異前の菌と同等であった。このことから、NAD<sup>+</sup>非依存ミオイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を指標にしたスクリーニングは、ミオイノシトールからシロイノソースの変換率の増加と相関性があることがわかった。

#### 【実施例4】

##### 【0084】

<変異菌株 (B7-14) を用いたミオイノシトールからシロイノソースの変換によるシロイノソースの製造>

500ml容ワッフル付き三角フラスコに、ミオイノシトール10g、酵母エキス (FNI205: Lallemand BI社製) 1g、グルコース0.5gを加え、100mlになる様に水に溶解し、pH5.0に調整し、オートクレーブにより滅菌した培地を20本 (2リットル相当: ミオイノシトール200g (1.11mol)) 作製し、これに、変異菌株 (B7-14) をスラントから、それぞれ1白金耳加えて、3日間、27℃、ロータリーシェーカーで培養した。

##### 【0085】

培養後、培養液を遠心分離し、得られた上清は、カラムに詰めた強酸性イオン交換樹脂 (DuoliteC20、H<sup>+</sup>タイプ) 500mlに溶解液を1分間に10mlの流速で通過させ、得られた溶出液を、カラムに詰めた弱塩基性イオン交換樹脂 (Duolite368S、OH<sup>-</sup>タイプ) 900ml

1に通過させ、さらに、得られた溶出液を、カラムに詰めた活性炭50mlに通過させた。得られた溶出液を濃縮し、白色粉末162g (0.91mol)を得た(収率82%)。本物質をNMRと、HPLCにより分析した結果、本物質には、シロイノソースが91%、ミオイノシトール3%、シロイノシトール6%が含まれていた(シロイノソース純度91%)。

#### 【実施例5】

##### 【0086】

＜変異菌株(B7-14)を用いたミオイノシトールからシロイノソースの変換と化学還元によるシロイノシトールの製造＞

500ml容ワッフル付き三角フラスコに、ミオイノシトール10g、酵母エキス(FNI205: Lallemand BI社製)1g、グルコース0.5gを加え、100mlになる様に水に溶解し、pH 5.0に調整し、オートクレーブにより滅菌した培地を20本(2リットル相当: ミオイノシトール200g (1.11mol))作製し、これに、変異菌株(B7-14)をスラントから、それぞれ1白金耳加えて、3日間、27℃、ロータリーシェーカーで培養した。

##### 【0087】

培養後、培養液を8000×gで遠心分離し、得られた上清約2リットルを、5規定NaOH溶液を用いて、pH7.5に調整した。これに攪拌しながら、 $\text{NaBH}_4$  9.2gを加えて還元反応を行なった。反応熱で反応液の温度は37℃に上昇した。30分後、不溶物が徐々に現れ、ここに1.2リットルの水を加えて、発生する不溶物を殆ど溶解した。この溶液をろ過し、不溶物を取り除いたろ液は、カラムに詰めた強酸性イオン交換樹脂(DuoliteC20、 $\text{H}^+$ タイプ)500mlに溶解液を1分間に10mlの流速で通過させ、得られた溶出液を、カラムに詰めた強塩基性イオン交換樹脂(DuoliteA116、 $\text{OH}^-$ タイプ)900mlに通過させ、さらに、得られた溶出液を、カラムに詰めた活性炭300mlに通過させた。得られた溶出液を濃縮し、白色粉末145gを得た。本物質をHPLCにより分析した結果、本物質には、シロイノシトールが36%、ミオイノシトール64%が含まれていた。

##### 【0088】

得られた白色粉末を、水で470mlになるように懸濁し、70℃に加熱し、ミオイノシトールを十分溶解させた。30℃まで攪拌しながら冷却し、白濁した溶液をろ過して、不溶物を集めた。不溶物は少量の水で洗浄し、乾燥後、44.2gの粉末として得られた。本物質をHPLCにより分析した結果、本物質には、シロイノシトールが98%、ミオイノシトール2%が含まれていた。さらに、得られた粉末に700mlの水を加えて、85℃に加熱し、全て溶解させ、徐々に攪拌しながら、30℃まで冷却し、ここにエタノールを700ml加えた。一晩、室温で放置後、得られた結晶をろ過して集め、乾燥後、40.1g (222.8mmol)の結晶を得た(収率20%)。結晶をNMRおよびHPLCにより分析した結果、本物質は、99.9%以上の純度のシロイノシトールであった。

#### 【産業上の利用可能性】

##### 【0089】

本発明は医薬又は医薬原料などとして有用な、シロイノソース及びシロイノシトールの工業的製造に関するものであり、産業上に有用である。

## 【書類名】要約書

## 【要約】

【課題】 新規なミオーイノシトールデヒドロゲナーゼを単離する。ミオーイノシトールを効率よくシロイノソースに変換する能力を有する微生物をスクリーニングする。酵素又は微生物を用いてシロイノソース及びシロイノシトールを効率よく製造する。

【解決手段】 新規なNAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼを微生物より単離精製する。また、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼの活性を指標にして、該酵素活性の高い微生物をスクリーニングする。NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトールデヒドロゲナーゼ又は該酵素の活性が高い微生物を、ミオーイノシトールに作用させることにより、シロイノソースを製造する。得られたシロイノソースを還元することによりシロイノシトールを製造する。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-353490
受付番号	50301702588
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年10月20日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成15年10月14日

特願 2 0 0 3 - 3 5 3 4 9 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 2 4 2 0 0 2 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 6 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋本石町 4 丁目 4 番 2 0 号

氏 名

北興化学工業株式会社